

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 20, 1982, pp. 875–881

Kohlenhydratgehalt von Lipoproteinen nach sequentieller Präzipitation mittels Phosphorwolframat-Magnesiumchlorid¹⁾

Von H. Sirowej, Ruth Krieger und R. Kattermann

Klinisch-Chemisches Institut, Klinikum Mannheim der Universität Heidelberg

(Eingegangen am 4. März/3. August 1982)

Zusammenfassung: Es wird eine rasch durchführbare Methode zur Bestimmung von Lipoprotein-gebundenen Kohlenhydraten in Humanseren beschrieben. Die Methode beruht auf der Abtrennung der Lipoproteine aus Vollserum durch sequentielle Präzipitation mit Natriumphosphorwolframat und Magnesiumchlorid. Nach Reinigung der abgetrennten Lipoproteine durch zweimalige Repräzipitation werden Neutralzucker, Aminosucker und N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) kolorimetrisch bestimmt. Die Variationskoeffizienten für die Präzision in der Serie liegen zwischen 3,2% und 7,3%. Die Bestimmung der Lipoprotein-gebundenen Kohlenhydrate nach Präzipitation wird verglichen mit den Ergebnissen nach Ultrazentrifugation. Die Gehalte an Neutralzucker, Aminosucker und N-Acetylneuraminsäure in den 3 Lipoproteinklassen VLDL, LDL und HDL stoffwechselgesunder Kontrollpersonen werden mitgeteilt.

Carbohydrate content of lipoproteins after successive precipitation with phosphotungstate magnesium chloride

Summary: A method is described for rapid determination of protein-bound carbohydrates in human lipoproteins. The method is based on a successive precipitation of lipoproteins with sodium phosphotungstate and magnesium chloride. After purification of the separated lipoproteins by a twofold reprecipitation, a colorimetric determination of hexoses, hexosamines and N-acetylneuraminic acid (sialic acid) is performed. The coefficients of variation in the series are between 3.2% and 7.3%. The results for lipoprotein-bound carbohydrates after precipitation are compared with the corresponding values after separation by ultracentrifugation. The concentrations of hexoses, hexosamines and N-acetylneuraminic acid in the 3 lipoprotein classes VLDL, LDL and HDL of control persons are reported.

Einführung

Die Mehrzahl der Plasmaproteine sind Glykoproteine, deren Oligosaccharidgruppen N- oder O-glykosidisch über die Aminosäuren Asparagin, Threonin oder Serin an den Proteinrest gebunden werden. Am Aufbau dieser Oligosaccharid-Seitenketten beteiligen sich *Neutralzucker* (*D*-Mannose, *D*-Galactose, *D*-Glucose, *D*-Xylose und *L*-Fucose), *Aminosucker* (N-Acetyl-*D*-glucosamin und N-Acetyl-*D*-galactosamin), sowie die meist endständig vorkommende *N-Acetylneuraminsäure* (1, 2). Durch kolorimetrische Gruppenreaktionen konnte bereits in den fünfziger Jahren gezeigt werden, daß auch die *Lipoproteine* des menschlichen Plasmas einen signifikanten Kohlenhydratanteil besitzen (3). Es gilt als sicher, daß die verschiedenen Zuckerkomponenten durch enzymatische Glykosylierung im endoplasma-

tischen Retikulum und im *Golgi*-Apparat der Zelle auf das naszierende Lipoprotein übertragen werden (4, 5). Als Akzeptorproteine kommen hierbei infrage das Apolipoprotein B (6) und nach neueren Untersuchungen auch das Apolipoprotein E (7). Für das Apolipoprotein C III konnte nicht nur die Zusammensetzung der Oligosaccharid-Seitenkette, sondern auch deren struktureller Aufbau geklärt werden (8).

Im Rahmen eigener Untersuchungen zur enzymatischen Glykosylierung von Lipoproteinen bei Diabetes mellitus (9) ergab sich die Forderung nach einer einfachen und doch empfindlichen Bestimmungsmethode für den Kohlenhydratanteil in Lipoproteinfraktionen. Die bisher angewandten Methoden der Isolierung von Lipoproteinen durch Dichtentrennung in der Ultrazentrifuge und Bestimmung der Kohlenhydrate mittels Gas-Flüssig-Chromatographie nach Derivatisierung erfordern größere Probenmengen (5–10 ml Serum) und sind apparativ und zeit-

¹⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Ka 388/4).

lich sehr aufwendig. Als Alternative hierzu erschien uns die sequentielle Präzipitation der Lipoproteine durch Polyanionen und zweiwertige Kationen mit anschließender kolorimetrischer Bestimmung von Neutralzuckern, Aminosuktern und N-Acetylneuraminsäure im Präzipitat geeignet. Wir beschreiben im folgenden eine solche Methode, die eine quantitative Bestimmung der Lipoprotein-gebundenen Kohlenhydrate aus 1000 μ l Serum gestattet und deren Ergebnisse mit denen nach Isolierung der Lipoproteine durch Ultrazentrifugation gut übereinstimmen.

Material und Methoden

Probenmaterial

Den nüchternen Probanden wurden jeweils 25 ml Blut aus der Armvene entnommen und nach der Gerinnung das Serum durch Zentrifugation (3000 min^{-1} , 5 min) abgetrennt. Je 2 \times 500 μ l Serum wurden zur Lipoproteinpräzipitation und je 10 ml Serum zur Lipoproteinisolierung mittels präparativer Ultrazentrifugation eingesetzt.

Reagenzien

Cholesterin-Testkombination (Fa. Boehringer Mannheim, Nr. 236691), Humanalbumin (Behringwerke, Marburg), Sudan-schwarz B, Coomassieblau R-250, N-Acetylneuraminsäure (Fa. Serva, Heidelberg). Alle anderen Reagenzien (p.a.) waren Handelspräparate der Fa. Merck, Darmstadt.

Lösungen

Natriumphosphorwolframat (440 g/l):

44 g Wolframatphosphorsäure (Fa. Merck, Nr. 583) wurden in 100 ml 1,5 mol/l Natriumhydroxid unter Rühren gelöst (pH 7,4). Aus dieser Stammlösung für die Präzipitation von HDL wurden durch Verdünnen mit dest. Wasser Konzentrationen von 48 g/l (LDL-Präzipitation) und 1,44 g/l (VLDL-Präzipitation) erhalten. Chargenbedingte Unterschiede besonders im Wassergehalt der Wolframatphosphorsäure $\text{H}_3[\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4] \cdot x\text{H}_2\text{O}$ sind möglich.

Geräte

Eppendorf-Mikrolitersystem 3000 (Fa. Eppendorf, Hamburg), Ultrazentrifuge L5-50 mit Rotor 50.1 Ti (Fa. Beckman, München), UGI-Elektrophoresesystem (Fa. Desaga, Heidelberg).

Ultrazentrifugation

Die präparative Ultrazentrifugation wurde nach der Methode von Havel et al. (10) durchgeführt. Je 2 \times 5 ml Serum wurden mit 0,1 mol/l NaCl ($d = 1,006 \text{ kg/l}$) überschichtet und 18 Stunden bei 4 °C und 50000 min^{-1} zentrifugiert. Nach Abtrennung der VLDL-Schicht wurde der Unterstand zur Isolierung von LDL mit NaCl auf die Dichte $d = 1,063 \text{ kg/l}$, anschließend zur Isolierung von HDL mit KBr auf die Dichte 1,21 kg/l eingestellt und 18 Stunden bzw. 40 Stunden bei 4 °C und 50000 min^{-1} zentrifugiert. Die erhaltenen Lipoproteinfraktionen wurden 48 Stunden bei 4 °C gegen ein 100 faches Volumen dest. Wasser dialysiert, wobei das Wasser jeweils nach 12 Stunden gewechselt wurde. Die Volumina der Fraktionen wurden nach Beendigung der Dialyse mit bidest. Wasser auf das ursprüngliche Serumvolumen (10 ml) aufgefüllt.

Lipoproteinelektrophorese im Agarosegel

Die Elektrophorese wurde in einem Serva-UGI-System (Fa. Serva, Heidelberg) nach Noble (11) durchgeführt. 0,8 g

Agarose wurden in 50 ml Veronal-Puffer (0,05 mol/l, pH 8,6) aufgekocht. Nach Verflüssigung des Gels wurde mit Puffer auf 100 ml aufgefüllt. Nach Abkühlen des Agarosegels auf etwa 60 °C wurden bei Elektrophoresen mit anschließender Lipid-anfärbung dem Gel 1 ml einer Rinderalbuminlösung (100 g/l) zugesetzt. Agarosegele für Elektrophoresen mit nachfolgender Proteinanfärbung blieben demgegenüber ohne Albuminzusatz. Je 50 ml Gel wurden auf Glasplatten (90 \times 120 mm) ausgegossen. 30 μ l Serum oder gelöstes Präzipitat wurden mit 30 μ l warmer Agaroselösung vermischt und 30 μ l dieser Mischung in die ausgestanzten Auftragsreservoirs pipettiert. Die elektrophoretische Trennung benötigte bei 120 V/50 mA etwa zwei Stunden. Zur Proteinanfärbung wurden die Gele drei Stunden in eine ethanolische Lösung von Coomassie-Blau (3 g/l) gelegt. Die Lipidfärbung der Gele erfolgte nach dem Trocknen in einer gesättigten Lösung von Sudanschwärz in 600 ml/l Ethanol.

Präzipitation der Lipoproteine

Eine sequentielle dreistufige Präzipitation von Lipoproteinen durch Polyanionen und zweiwertige Kationen wurde von verschiedenen Autoren beschrieben. Leiss et al. (12) verwenden für die Fällung der drei Lipoproteinklassen Heparin/Magnesiumchlorid, Dextransulfat/Magnesiumchlorid und Dextransulfat/Manganchlorid. Demgegenüber erzielen wir bei der hier beschriebenen Methode eine sequentielle Präzipitation von VLDL, LDL und HDL durch steigende Konzentrationen von Natriumphosphorwolframat und Magnesiumchlorid nach Burstein et al. (13). Aufgrund elektrophoretischer Reinheitsprüfungen der präzipitierten Lipoproteinfraktionen wurden von uns abweichende Endkonzentrationen der Fällungsmittel gewählt (s. Tab. 1). Durch Reduzierung der eingesetzten Serummenge auf 500 μ l läßt sich die Präzipitation apparativ einfach und schnell mit dem Mikrolitersystem 3000 der Fa. Eppendorf, Hamburg, durchführen.

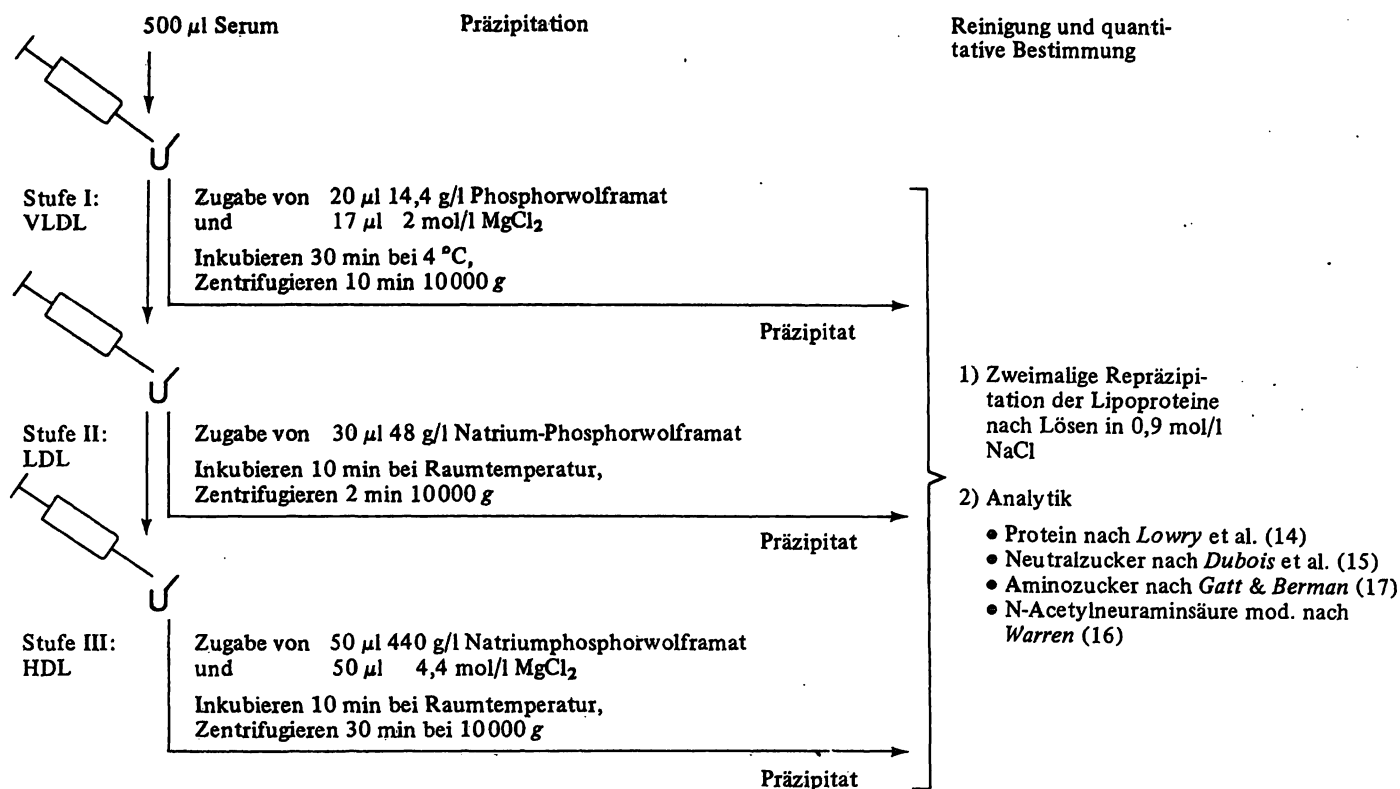
Tab. 1. Endkonzentrationen der verwendeten Fällungsreagenzien bei der Präzipitation von Lipoproteinen mit Natriumphosphorwolframat und Magnesiumchlorid.

Lipo-protein-	Fällungs-reagenzien	Eigene Konzentrationen	Burstein et al. (13)
VLDL	Wolframat MgCl ₂	0,55 g/l 0,065 mol/l	0,5 g/l 0,1 mol/l
LDL	Wolframat MgCl ₂	3,0 g/l 0,065 g/l	2,0 g/l 0,1 mol/l
HDL	Wolframat MgCl ₂	40 g/l 0,4 mol/l	20 g/l 0,2 mol/l

Im folgenden beschreiben wir eine dreistufige Methode auf der Basis der Natriumphosphorwolframat/Magnesiumchlorid-Fällung, die die sequentielle Präzipitation von VLDL, LDL und HDL gestattet sowie ein verkürztes zweistufiges Vorgehen für VLDL + LDL und HDL.

a) Dreistufige Präzipitationsmethode (Schema 1)

VLDL wurde durch Zugabe von 20 μ l 14,4 g/l Natriumphosphorwolframat und 17 μ l 2 mol/l Magnesiumchlorid zu 500 μ l Serum präzipitiert (Endkonzentration im Test: 0,55 g/l Natriumphosphorwolframat und 0,065 mol/l Magnesiumchlorid). Eine gute Trennung von VLDL und LDL wird nur durch genaue Beachtung der Konzentrationen erreicht. Selbst geringe Änderungen in der Zusammensetzung der Fällungsreagentien wirken sich erheblich auf die Richtigkeit der VLDL-Präzipitation aus. Nach 30 min Inkubation bei 0 °C wurde 10 min bei 10000 g zentrifugiert. Mit einer Mikroliterspritze wurde danach der klare Unterstand vorsichtig vom VLDL-Flotat abgetrennt und in ein zweites Reaktionsgefäß zur anschließenden Fällung von LDL überführt. Zur weiteren Reinigung von begleitenden



Schema 1. Dreistufige sequentielle Präzipitation der Lipoproteine mit Natriumphosphorwolframat und Magnesiumchlorid.

Serumproteinen wurde das VLDL-Flotat in 100 µl 0,9 mol/l Natriumchlorid gelöst und nach Zugabe von 400 µl 0,02 mol/l Tris-Puffer (pH 7,7) durch gleiche Mengen Natriumphosphorwolframat und Magnesiumchlorid repräzipitiert. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde 10 min bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das VLDL-Präzipitat nochmals wie beschrieben gelöst und repräzipitiert. Das so gereinigte Präzipitat wurde in 500 µl 0,9 mol/l Natriumchlorid durch Schütteln homogenisiert.

Zur LDL-Fällung wurden 30 µl 48 g/l Natriumphosphorwolframat zu 500 µl des klaren Unterstandes nach VLDL-Präzipitation gegeben (Endkonzentration im Test: 3,0 g/l Natriumphosphorwolframat und 0,065 mol/l Magnesiumchlorid). Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur und 2 min Zentrifugation bei 10000 g wurde das LDL-Präzipitat sedimentiert. Der klare Überstand wurde in ein weiteres Reaktionsgefäß zur anschließenden HDL-Fällung überbracht. Das LDL-Präzipitat wurde in 100 µl 0,9 mol/l NaCl unter Schütteln gelöst und nach Zugabe von 400 µl 0,02 mol/l Tris-Puffer (pH 7,7) mit 12 µl 2 mol/l Magnesiumchlorid repräzipitiert. Nach der Zentrifugation wurde das Präzipitat in gleicher Weise nochmals gelöst und repräzipitiert. Anschließend wurde es in 500 µl 0,9 mol/l NaCl gelöst.

Zur abschließenden Präzipitation von HDL wurden 50 µl 440 g/l Natriumphosphorwolframat und 50 µl 4,4 mol/l Magnesiumchlorid zu 500 µl Überstand nach LDL-Fällung gegeben (Endkonzentrationen im Test: 40,0 g/l Natriumphosphorwolframat und 0,4 mol/l Magnesiumchlorid). Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde 30 min bei 10000 g zentrifugiert. Das sedimentierte HDL-Präzipitat wurde in 500 µl 1,2 mol/l $NaHCO_3$ unter Schütteln gelöst und durch Zugabe der gleichen Mengen an Fällungsreagenzien repräzipitiert. Diese Repräzipitation wurde nochmals wiederholt. Das gereinigte HDL-Präzipitat wurde in 500 µl 1,2 mol/l $NaHCO_3$ aufgenommen.

b) Zweistufige Präzipitationsmethode

Durch Zugabe von 35 µl 48 g/l Natriumphosphorwolframat und 15 µl 2 mol/l Magnesiumchlorid wurden VLDL + LDL

gemeinsam präzipitiert. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde durch 2 min Zentrifugation bei 10000 g das Präzipitat sedimentiert. Das Präzipitat wurde in 100 µl 0,9 mol/l NaCl gelöst und nach Zugabe von 400 µl 0,02 mol/l Tris-Puffer mit den oben beschriebenen Fällungsreagenzien repräzipitiert. Lösen und Repräzipitieren wurden nochmals in gleicher Weise wiederholt und die Präzipitate zuletzt in 500 µl 0,9 mol/l NaCl zur Durchführung der Analysen gelöst. Die Präzipitation von HDL erfolgt bei zweistufigem Vorgehen in gleicher Weise, wie bereits bei der dreistufigen Methode beschrieben.

Chemische Analysen

In den gelösten Präzipitaten (500 µl) wurden Protein (Probenvolumen: 25 µl) nach Lowry et al. (14), Neutralzucker (Probenvolumen: 250 µl) nach Dubois et al. (15) und N-Acetylneuraminsäure (Probenvolumen: 100 µl) nach einer von uns beschriebenen Mikromethode (16) bestimmt. Die Bestimmung von Aminosuckern wurde aus einem zweiten Ansatz (500 µl) nach Gatt & Berman (17) durchgeführt. Die Konzentrationen von Neutralzuckern (Standard: Mannose + Galaktose 1:1), Aminosuckern (Standard: N-Acetylglucosamin + N-Acetylgalaktosamin 1:1) und N-Acetylneuraminsäure wurden in µmol/l berechnet und wegen allfälliger Verluste auf das im Präzipitat gleichzeitig gemessene Gesamt-Apolipoprotein bezogen (µmol/g).

Ergebnisse und Diskussion

Reinheitsprüfung der Lipoprotein-Präzipitate

Tabelle 2a zeigt die Konzentrationen von Protein, Cholesterin und N-Acetylneuraminsäure in den Lipoproteinfraktionen nach zweistufiger sequentieller Präzipitation eines Humanserums, verglichen mit den Ergebnissen der Lipoproteine nach Isolierung durch Ultrazentrifugation.

Dabei zeigt sich, daß die Konzentrationen von Protein und N-Acetylneuraminsäure in den Lipoprotein-Präzipitaten der ersten Fällung um ein Vielfaches höher sind gegenüber den Lipoproteinen nach Ultrazentrifugation, während die Cholesterinkonzentrationen nach beiden Isolierungsmethoden gut übereinstimmen. Dies deutet darauf hin, daß bei der ersten Präzipitation zwar die gesamten Lipoproteine der jeweiligen Dichteklassen gefällt werden, daneben jedoch noch andere Serumglykoproteine mitpräzipitieren.

Entsprechend ist vor der Kohlenhydrat-Bestimmung eine Reinigung der präzipitierten Lipoproteine von den Begleitproteinen durch Lösung und Wiederausfällen unumgänglich. Nach der ersten Repräzipitation nehmen der Protein- und N-Acetylneuraminsäure-Gehalt im Präzipitat deutlich ab bei gleichbleibenden Cholesterin-

werten (s. Tab. 2). Nach einem weiteren Reinigungsschritt durch eine zweite Repräzipitation zeigt sich anhand der Bestimmungen von Protein, Cholesterin und N-Acetylneuraminsäure eine gute Übereinstimmung zwischen Lipoproteinen nach Präzipitation und solchen nach Ultrazentrifugation. Bei drei- oder viermaliger Repräzipitation nehmen die Konzentrationen von Protein, Cholesterin und N-Acetylneuraminsäure deutlich ab. Dies deutet darauf hin, daß nunmehr gravierende Lipoprotein-Verluste bei weiteren Reinigungsschritten auftreten.

Für das dreistufige Vorgehen der Lipoproteinpräzipitation ergibt sich in Tabelle 2b ein ähnliches Bild. Auch hier weisen die Rohpräzipitate aller Lipoproteinfraktionen gegenüber den Lipoproteinen nach Ultrazentrifugation einen sehr viel höheren Proteingehalt auf. Nach

Tab. 2. Reinigungsschritte und Konzentrationen von Protein, Cholesterin und N-Acetylneuraminsäure nach sequentieller Präzipitation zweier Humansen mit Natriumphosphorwolframat und Magnesiumchlorid. Vergleich mit den Ergebnissen nach Ultrazentrifugation (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen).

Liproteinklassen	Protein g/l	Cholesterin mmol/l	Cholesterin mmol/g Protein	N-Acetylneuraminsäure μmol/l	μmol/g Protein
I. Zweistufiges Vorgehen (Serum A)					
VLDL + LDL (Stufe I)					
Präzipitation	4,25	3,35	0,78	242	56,9
nach 1. Repräzipitation	1,45	3,35	2,31	79,9	55,1
nach 2. Repräzipitation	1,20	3,33	2,77	56,1	46,7
nach 3. Repräzipitation	0,92	2,91	3,16	40,9	44,4
nach 4. Repräzipitation	0,82	2,78	3,39	34,2	41,7
Ultrazentrifugation	1,18	3,28	2,77	54,6	46,2
HDL (Stufe II)					
Präzipitation	13,4	0,98	0,07	47,8	3,5
nach 1. Repräzipitation	1,89	0,97	0,51	81,4	43,0
nach 2. Repräzipitation	1,22	0,92	0,75	41,3	33,8
nach 3. Repräzipitation	1,15	0,83	0,72	35,0	30,4
nach 4. Repräzipitation	0,95	0,68	0,71	27,0	28,4
Ultrazentrifugation	1,21	0,95	0,78	40,1	33,1
II. Dreistufiges Vorgehen (Serum B)					
VLDL					
Präzipitation	0,96	0,59	0,61	32,0	33,3
nach 1. Repräzipitation	0,44	0,56	1,27	16,6	37,7
nach 2. Repräzipitation	0,24	0,56	2,33	12,8	53,3
Ultrazentrifugation	0,26	0,53	2,03	13,5	51,9
LDL					
Präzipitation	3,95	2,55	0,64	138	34,9
nach 1. Repräzipitation	1,10	2,52	2,29	53,0	48,1
nach 2. Repräzipitation	0,84	2,47	2,94	46,1	54,9
Ultrazentrifugation	0,82	2,49	3,03	45,7	55,7
HDL					
Präzipitation	15,6	1,09	0,07	58,7	3,8
nach 1. Repräzipitation	2,38	1,07	0,45	74,4	31,2
nach 2. Repräzipitation	1,20	1,01	0,84	40,1	33,4
Ultrazentrifugation	1,15	1,04	0,90	38,5	33,5

zweimaliger Repräzipitation zeigt sich eine gute Übereinstimmung in den untersuchten Kenngrößen zwischen den Lipoproteinfraktionen nach beiden Isolierungsmethoden. Zur weiteren Reinheitsprüfung der präzipitierten Lipoproteine wurden Agarose-Elektrophoresen durchgeführt. In Übereinstimmung mit der Proteinanalytik zeigen sich nach Proteinfärbung mit Coomassie-Blau (Abb. 1a) in den Rohpräzipitaten neben den Lipoproteinen noch andere Serumproteine, besonders Albumin und Immunglobuline. Nach zweimaliger Repräzipitation sind diese Begleitproteine entfernt und die Lipoproteinfraktionen elektrophoretisch rein. Nach Lipidfärbung mit Sudan-Schwarz (Abb. 1b) ergeben sich keine gravierenden Unterschiede zwischen Roh- und Repräzipitat bezüglich ihrer elektrophoretischen Mobilität.

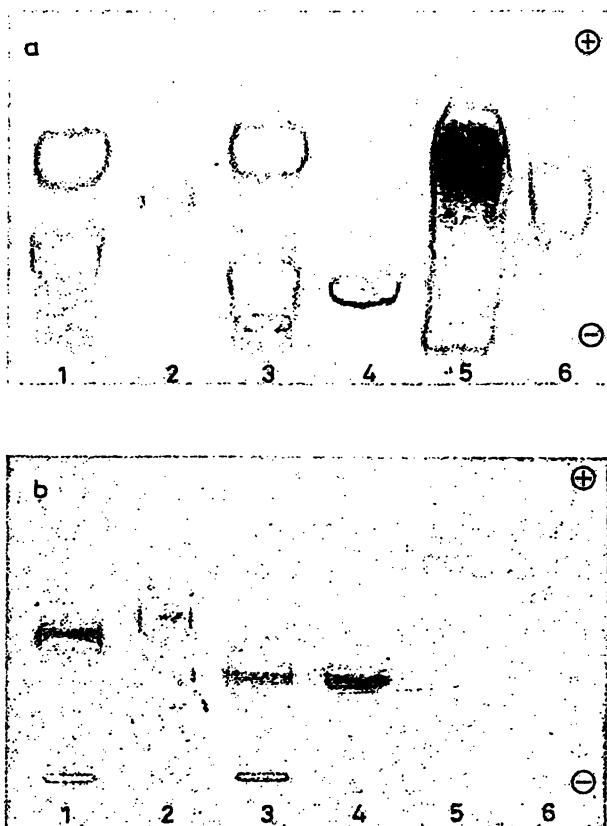


Abb. 1. Reinheitsprüfung der Lipoproteinpräzipitate durch Agaroseelektrophorese.

a = Proteinfärbung mit Coomassie-Blau

b = Lipidfärbung mit Sudan-Schwarz

1 = VLDL-Rohpräzipitat

2 = VLDL-Präzipitat, 2 × repräzipitiert

3 = LDL-Rohpräzipitat

4 = LDL-Präzipitat, 2 × repräzipitiert

5 = HDL-Rohpräzipitat

6 = HDL-Präzipitat, 2 × repräzipitiert

Aufgrund dieser Ergebnisse halten wir die hier beschriebene Methode als geeignet zur Isolierung reiner Lipoproteinfraktionen aus Humanserum (< 1 ml). Die Gütekriterien dieser Methode werden in den folgenden Abschnitten kurz dargestellt.

Präzision

Trotz zweifacher Repräzipitation der Lipoproteine und dadurch bedingt mehrfacher Pipettierungen weist die beschriebene Methode eine gute Präzision auf: An einem Serum ergaben sich bei dem zweistufigen Vorgehen für VLDL + LDL Variationskoeffizienten in der Serie (n = 14): Protein 5,4%, Cholesterin 6,4%, Hexosen 6,9%, Hexosamine 6,5% und N-Acetylneuraminsäure 3,2%. Für HDL wurden gefunden: Protein 5,9%, Cholesterin 6,3%, Hexosen 7,1%, Hexosamine 7,3% und N-Acetylneuraminsäure 5,9%. Die Variationskoeffizienten liegen damit bei dieser Präzipitationsmethode in dem gleichen Bereich, der für Protein und Cholesterin auch bei der Isolierung der Lipoproteine durch Ultrazentrifugation gefunden wurde (18).

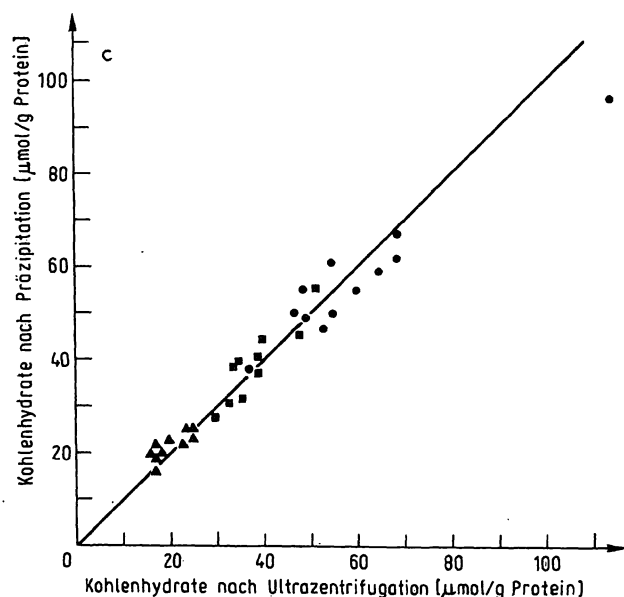
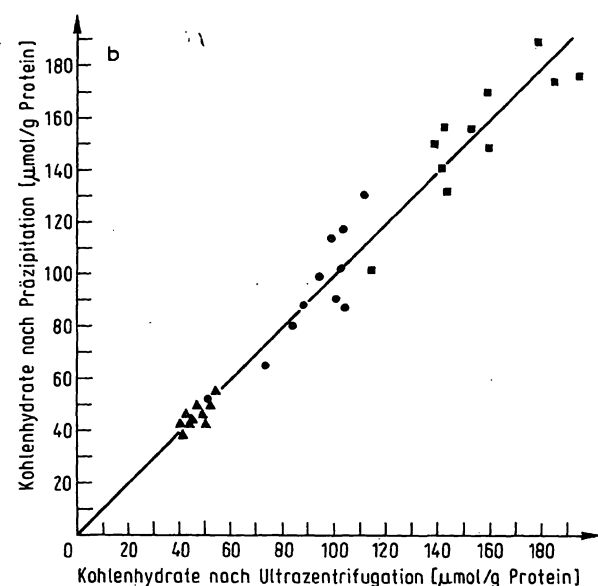
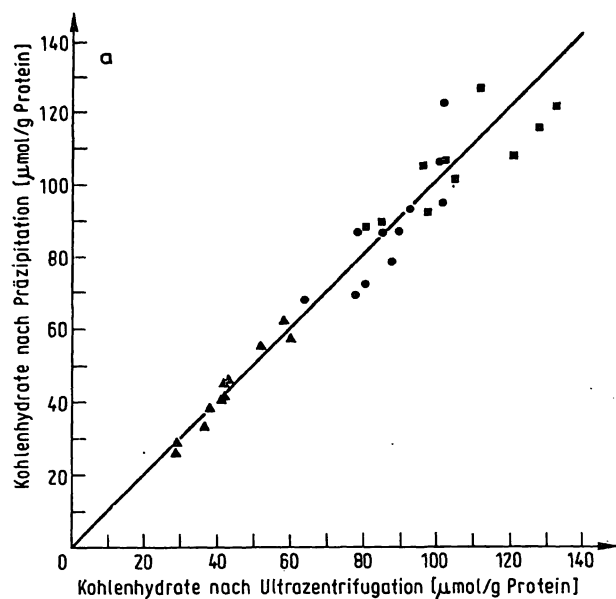
Richtigkeit

Abbildung 2a–c zeigen die Ergebnisse der kolorimetrischen Bestimmungen der Kohlenhydratgruppen Neutralzucker, Aminos Zucker und N-Acetylneuraminsäure in den drei Lipoproteinfraktionen bei einem Vergleich zwischen Isolierung durch Ultrazentrifugation (x = Achse) und durch Präzipitation (y = Achse) in 10 Seren. In Tabelle 3 sind die hierbei ermittelten Korrelationskoeffizienten und Regressionsgleichungen aufgeführt. Es findet sich eine befriedigende Korrelation mit Koeffizienten zwischen 0,80 und 0,97. Mit Ausnahme der Bestimmungen von Neutralzucker im VLDL sowie Aminos Zucker und N-Acetylneuraminsäure im HDL entsprechen die Verläufe der Regressionsgeraden nahezu der Identitätslinie, wobei y zwischen 0,96 x und 1,15 x liegt.

Tab. 3. Regressionsanalysen der Kohlenhydratbestimmungen in Lipoproteinen aus Humanserum (n = 10) bei dreistufigem Vorgehen.

x = Lipoproteinisolierung durch Ultrazentrifugation
y = Lipoproteinisolierung durch Präzipitation

Lipo-protein-fraktion	Kohlenhydratgruppe	r	y = b x + a (μmol/g)
VLDL	Neutralzucker	0,85	y = 0,61 x + 38
	Aminos Zucker	0,83	y = 1,11 x - 9
	N-Acetylneuraminsäure	0,97	y = 1,15 x - 4,7
LDL	Neutralzucker	0,85	y = 0,96 x + 4,9
	Aminos Zucker	0,87	y = 1,10 x - 13
	N-Acetylneuraminsäure	0,85	y = 0,99 x - 0,3
HDL	Neutralzucker	0,90	y = 1,13 x - 4,0
	Aminos Zucker	0,96	y = 0,75 x + 14,0
	N-Acetylneuraminsäure	0,80	y = 0,62 x + 8,7



Referenzwerte

In Tabelle 4a + b sind die Kohlenhydratkonzentrationen in Lipoproteinen bei Normalpersonen erfasst, wobei wiederum Präzipitation und Ultrazentrifugation einander gegenübergestellt werden. Bei der dreistufigen Präzipitation (Tab. 4a) finden wir im VLDL nach Präzipitation durch Addition der Konzentrationen der drei Kohlenhydratgruppen unter Berücksichtigung ihrer Molmassen einen Gesamt-Kohlenhydratgehalt von 5,3% gegenüber 5,0% bei der Ultrazentrifugation. Im Vergleich hierzu fanden wir nach Ultrazentrifugation und gaschromatographischer Bestimmung der Kohlenhydrate im VLDL einen Gesamtkohlenhydratanteil von 4,38% (19), während *Fontaine & Malmendier* (20) nach Ultrazentrifugation und kolorimetrischer Kohlenhydratbestimmung einen solchen von 9,30% ermittelte. Der Kohlenhydratgehalt im LDL nach Präzipitation wurde in der o.g. Arbeit mit 4,87% bestimmt. Die Vergleichsangaben hierzu von anderen Autoren liegen bei 4,78% (21) und 8,90% (22). HDL weist, bedingt durch den hohen Anteil der nicht-glykosylierten Apolipoproteine A I und A II den niedrigsten Kohlenhydratgehalt auf. Der Anteil von 2,3% nach Präzipitation liegt zwischen dem Vergleichswert von 3,22% bei *Fontaine & Malmendier* (17) und 1,51% bei unseren o.g. Untersuchungen (19).

Die hier beschriebene Methode zur Bestimmung Lipoprotein-gebundener Kohlenhydrate mittels sequentieller Präzipitation von VLDL, LDL und HDL durch Phosphorwolframat/Magnesiumchlorid und anschließender kolorimetrischer Bestimmungen von Neutralzuckern, Aminozuckern und N-Acetylneuraminsäure weist folgende Vorteile auf:

1. Der Kohlenhydratgehalt der 3 Lipoproteinklassen kann aus nur 1 ml Serum mit befriedigender Präzision und Richtigkeit gemessen werden.
2. Die erforderlichen Arbeitsgänge sind mit einfachen Laborgeräten durchführbar, d.h. Mikrozentrifuge statt Ultrazentrifuge und Photometer statt Gaschromatographie.
3. Der zeitliche Aufwand für eine komplette Analyse der 3 Lipoproteinfraktionen liegt erheblich niedriger als bei Ultrazentrifugation und nachfolgender Gaschromatographie. Ein geübter Untersucher vermag etwa 12 Serumproben in zwei Arbeitstagen zu analysieren.

Die beschriebene Präzipitationsmethode wurde an normolipämischen und leicht hyperlipämischen Seren geprüft. Eine generelle Anwendbarkeit auch bei stark hyperlipämischen und dyslipämischen Seren ist vor einer klinischen Anwendung noch weitergehend zu untersuchen.

Abb. 2. Vergleichende Bestimmung Lipoprotein-gebundener Kohlenhydrate nach Präzipitation und Ultrazentrifugation; ausgezogen = Identitätsgerade
 ■ Neutralzucker • Aminozucker ▲ N-Acetylneuraminsäure
 a) VLDL b) LDL c) HDL

Tab. 4. Kohlenhydratgehalt in Lipoproteinen von Humanseren (n = 10) nach Präzipitation mit Phosphorwolframat-Magnesiumchlorid und nach Ultrazentrifugation.

Lipoproteinklasse	Protein (g/l)	Neutral- zucker $\mu\text{mol/g}$ Protein	Amino- zucker $\mu\text{mol/g}$ Protein	N-Acetylneura- minsäure $\mu\text{mol/g}$ Protein	Gesamt- Kohlenhydrate g/100 g Protein
a) Dreistufiges Vorgehen					
VLDL					
a) nach Präzipitation	0,17 \pm 0,05	118 \pm 18,3	81,7 \pm 24,2	45,5 \pm 12,6	5,3
b) nach Ultrazentrifugation	0,14 \pm 0,06	100 \pm 19,8	87,3 \pm 12,3	44,1 \pm 8,3	5,0
LDL					
a) nach Präzipitation	0,82 \pm 0,17	156 \pm 15,9	94,2 \pm 20,6	43,3 \pm 5,9	6,2
b) nach Ultrazentrifugation	0,88 \pm 0,11	140 \pm 20,2	89,6 \pm 15,7	44,0 \pm 4,1	5,8
HDL					
a) nach Präzipitation	0,93 \pm 0,21	55,3 \pm 16,5	31,2 \pm 7,2	20,2 \pm 3,4	2,3
b) nach Ultrazentrifugation	0,98 \pm 0,15	63,5 \pm 18,5	37,1 \pm 5,8	20,9 \pm 3,2	2,6
b) Zweistufiges Vorgehen (12 andere Humanseren)					
VLDL + LDL					
a) nach Präzipitation	0,99 \pm 0,19	158 \pm 36	110 \pm 25	52,8 \pm 8,7	6,8
b) nach Ultrazentrifugation	1,08 \pm 0,22	154 \pm 37	116 \pm 26	53,8 \pm 10,1	6,9
HDL					
a) nach Präzipitation	1,11 \pm 0,22	55,5 \pm 8,2	49,2 \pm 10,1	25,4 \pm 0,6	2,8
b) nach Ultrazentrifugation	1,20 \pm 0,12	54,6 \pm 11,9	46,6 \pm 13,6	23,0 \pm 0,6	2,7

Literatur

- Schwick, H. G. & Haupt, H. (1980) *Angew. Chemie* 92, 83–95.
- Uhlenbruck, G., Reese, I., Vaith, P. & Haupt, H. (1979) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 17, 29–34.
- Heide, K., Schmidberger, R. & Schwick, G. (1957) *Behringwerke Mitt.* 33, 96–100.
- Bizzi, A. & Marsh, J. B. (1973) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 144, 762–765.
- Dolphin, P. J. & Rubinstein, D. (1977) *Can. J. Biochem.* 55, 83–90.
- Swaminathan, N. & Aladjem, F. (1976) *Biochemistry* 15, 1516–1522.
- Jain, R. S. & Quarfordt, S. (1979) *Life Sci.* 25, 1315–1324.
- Vaith, P., Assmann, G. & Uhlenbruck, G. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 541, 234–240.
- Sirowej, H., Stadler, H., Thomas, M., Kiss, P. & Kattermann, R. (1980) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 18, 752.
- Havel, R. J., Eder, H. A. & Bragdon, J. H. (1955) *J. Clin. Invest.* 34, 1345–1353.
- Noble, R. P. (1968) *J. Lip. Res.* 9, 693.
- Leiß, O., Murawski, U. & Egge, H. (1979) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 17, 619–625.
- Burstein, M., Scholnick, H. R. & Morfin, R. (1970) *J. Lip. Res.* 11, 583–595.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. (1956) *Analyt. Chem.* 28, 350–356.
- Kattermann, R. & Krieger, R. (1981) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19, 31–34.
- Gatt, R. & Berman, E. R. (1966) *Anal. Biochem.* 15, 167–171.
- Carlson, K. (1973) *J. Clin. Pathol.* 26, Suppl. 5, 32–37.
- Kattermann, R., Stadler, H., Thomas, M., Scharbert, F. & Sirowej, H. (1982) *Clin. Chim. Acta* (Manuskript eingereicht).
- Fontaine, M. & Malmendier, C. L. (1975) *Clin. Chim. Acta* 64, 91–93.
- Marshall, W. E. & Kummerow, F. A. (1962) *Arch. Biochem. Biophys.* 98, 271–276.
- Schultze, H. E. & Heide, K. (1960) *Med. Grundlagenforsch.* 3, 357–362.

Dr. Dr. Heinz Sirowej
Klinisch-Chemisches Institut
Klinikum Mannheim der
Universität Heidelberg
Postfach 23
D-6800 Mannheim 1

